

?ss pn = de 3930312
S2 1 PN = DE 3930312
?t s2/7/all

2/7/1
DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI
(c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008246197
WPI Acc No: 90-133198/199018
Nucleic acid sequencing - involving amplification-denaturation cycles in
presence of deoxy-nucleoside alpha-thio-triphosphate
Patent Assignee: MAX PLANCK GES FOERDERUNG WISSENSCHAFTEN (PLAC)
Inventor: ECKSTEIN F; GISH G; NAKAMAYE K; OLSEN D B; SPOKANE W; VOSBERG
H P

Number of Countries: 013 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
DE 3930312	A	19900426	DE 3930312	A	19890911		199018 B
WO 9004649	A	19900503					199021
EP 439537	A	19910807	EP 89912409	A	19891024		199132
JP 4501361	W	19920312	JP 89511501	A	19891024		199217

— Priority Applications (No Type Date): DE 3836201 A 19881024; DE 3930312 A
19890911

Cited Patents: 2.Jnl.Ref; DE 3546374; EP 200362; US 4521509; WO 8607612

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
WO 9004649	A					

Designated States (National): JP US

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE

EP 439537 A

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

JP 4501361 W 39 Based on WO 9004649

Abstract (Basic): DE 3930312 A

Nucleic acid sequencing is effected by (a) denaturing the nucleic acid; (b) adding oligonucleotide primers complementary to the ends of the antiparallel strands; (c) dividing the sample into 4 portions, corresp. to the 4 bases; (d) subjecting each portion to repeated amplification-denaturation cycles in the presence of a polymerase and a mixt. of 3 normal deoxynucleoside triphosphates and a deoxynucleoside alpha-thiotriphosphate (I) corresp. to the base in question, thereby generating amplified nucleic acids contg. (I) at the corresp. base posns.; (e) labelling the nucleic acids at one end during or after amplification; (f) shortening the nucleic acids back to each of the

(l)-contg. posns.; and (g) electrophoretically sepg. the resulting fragments.

ADVANTAGE - The process is simpler and quicker than prior art methods, since amplification and incorporation of (l) are effected simultaneously. (10pp Dwg.No.0/3)

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Additional): C12N-015/00; C12P-019/34;
C12Q-001/68; G01N-033/68

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
11 DE 3930312 A1

51 Int. Cl. 5:
C 12 P 19/34
C 12 N 15/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/68

21 Aktenzeichen: P 39 30 312.8
22 Anmeldetag: 11. 9. 89
43 Offenlegungstag: 26. 4. 90

THE BRITISH LIBRARY

16 MAY 1990
SCIENCE REFERENCE AND
INFORMATION SERVICE

DE 3930312 A1

30 Innere Priorität: 32 33 31
24.10.88 DE 38 36 201.5

71 Anmelder:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

74 Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000
München

72 Erfinder:

Eckstein, Fritz, Prof. Dr., 3400 Göttingen, DE;
Vosberg, Hans-Peter Prof. Dr., 6900 Heidelberg, DE;
Gish, Gerald, Dr., 3400 Göttingen, DE; Nakamaye,
Kay, Prof. Dr., Spokane, Wash., US; Olsen, David B.,
Dr., 3400 Göttingen, DE

54 Verfahren zur direkten Sequenzierung von Nukleinsäureketten

Die Erfindung betrifft eine direkte Sequenzierung von Nukleinsäureketten durch Denaturierung und dann Amplifizierung der zu sequenzierenden Bereiche durch mehrmaliges Durchlaufen eines Zyklus, umfassend

a) einen Nukleinsäure-Syntheseschritt, bei dem die zu sequenzierende Nukleinsäure als Matrizenstrang in Anwesenheit der vier Deoxynukleosidtriphosphate von einer Polymerase, ausgehend von Oligonukleotid-Primern, die zu den 3'-Enden der antiparallelen Stränge der zu sequenzierenden Nukleinsäuren komplementär sind, repliziert wird, gefolgt von

b) einem Denaturierungsschritt, wobei die entstandenen Nukleinsäuren während oder nach der Amplifizierung an ihrem einen Ende markiert werden. Die Sequenzierung der markierten Nukleinsäuren geschieht durch Einbau modifizierter Nukleotide an jeweils für eine Base spezifischen Positionen, Verkürzung der amplifizierten Nukleinsäuren jeweils bis zu diesen Positionen und elektrophoretische Auftrennung der entstandenen Nukleinsäurefragmente. Zum Einbau modifizierter Nukleotide bei der Amplifizierung in vier verschiedenen Ansätzen werden anstelle der vier Deoxynukleosidtriphosphate je ein Deoxynukleosid- α -thio-triphosphat zusammen mit den jeweils drei anderen unmodifizierten Deoxynukleosidtriphosphaten eingesetzt.

DE 3930312 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur direkten Sequenzierung von Nukleinsäureketten durch Denaturierung und dann Amplifizierung der zu sequenzierenden Bereiche durch mehrmaliges Durchlaufen eines Zyklus, umfassend

- a) einen Nukleinsäure-Syntheseschritt, bei dem die zu sequenzierende Nukleinsäure als Matrizenstrang in Anwesenheit der vier Deoxynukleosidtriphosphate von einer Polymerase, ausgehend von Oligonukleotid-Primern, die zu den 3'-Enden der antiparallelen Stränge der zu sequenzierenden Nukleinsäuren komplementär sind, repliziert wird, gefolgt von
- b) einem Denaturierungsschritt,

wobei die entstandenen Nukleinsäuren während oder nach der Amplifizierung an ihrem einen Ende markiert werden, Sequenzierung der markierten Nukleinsäuren durch Einbau modifizierter Nukleotide an jeweils für eine Base spezifischen Positionen, Verkürzung der amplifizierten Nukleinsäuren jeweils bis zu diesen Positionen und elektrophoretische Auftrennung der entstandenen Nukleinsäurefragmente.

Die Analyse der molekularen Grundlagen genetischer Krankheiten, die Erforschung von Polymorphismen, die Untersuchung von DNA auf phenotypische Mutationen sind nur einige der Aufgaben, für die eine genaue Feststellung der Nukleotidsequenz von Nukleinsäuren unerlässlich ist. Für solche Untersuchungen stehen jedoch oftmals nur geringe Mengen an Nukleinsäure zur Verfügung, was nicht ausreichend ist für eine Sequenzierung nach den gängigen Techniken. Ein weiteres Problem bereitet die Anwesenheit von zusätzlichem Fremd-Nukleinsäurematerial, das die Sequenzierung einer bestimmten Nukleinsäuresequenz erschwert. Ein großer Fortschritt auf diesem Gebiet ist die von Saiki et al., Science 230 (1985), 1350-1354 entwickelte sogenannte Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Technik, die ausgehend von geringen Nukleinsäuremengen eine exponentielle spezifische Synthese der gewünschten Nukleinsäuren oder Segmente davon erlaubt. Bei dieser Technik werden, ausgehend von zwei Primern, vorzugsweise kurzen synthetischen Oligonukleotiden Kettenextensionsreaktionen durchgeführt, wobei die beiden Primer zu den 3'-Enden der antiparallelen Stränge des gewünschten DNA-Segments komplementär sind. Diese Kettenextensionsreaktionen werden mehrfach durchgeführt, wobei während der Extensionszyklen durch Erhitzen denaturiert wird, wodurch sich die bei der Kettenextensionsreaktion gebildeten Nukleinsäuren von der ursprünglich vorhandenen Matrizen-DNA lösen und diese für eine neue Syntheserunde zugänglich machen. Auf diese Art und Weise können große Mengen der gesuchten Nukleinsäure oder des Nukleinsäurefragments in relativ kurzer Zeit synthetisiert werden.

Bekannte Methoden zur Sequenzierung von Nukleinsäuren sind beispielsweise die Sequenzierung von Maxam und Gilbert, Methods Enzymol. 65 (1980), 499-560, von Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 (1977), 5463 oder die Methode von G. Gish und F. Eckstein, Science, Vol. 240 (1988) 1520-1522. Bei der letztgenannten Methode wird bei einer von einem Primer ausgehenden Kettensynthese ähnlich wie bei der Sanger-Methode verfahren, jedoch anstelle vier verschiedener Dideoxynukleotide die entsprechenden Deoxynukleo-

sid-thiotriphosphate verwendet, und dann ein partieller Strangbruch an den Thiophosphatpositionen der gebildeten Nukleinsäuren chemisch bewirkt.

Eine Sequenzierung von durch PCR amplifizierter DNA ist beispielsweise nach der Methode von Sanger von Saiki et al., Science, Vol. 239 (1988), Seiten 487 bis 491 beschrieben. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, daß von der amplifizierten DNA unter Verwendung eines zusätzlichen Primers extra spezifisch für die vier Nukleotide DNA-Kopien nach der Kettenabbruchsmethode hergestellt werden müssen.

Die Sequenzierung von PCR-amplifizierter DNA nach der Maxam-Gilbert-Methode ist von Keohavong et al., in DNA, Vol. 7, Nr. 1, (1988), Seiten 63 bis 70 beschrieben. Diese Methode weist jedoch ebenfalls den Nachteil auf, daß nach der Amplifizierung eine ganz normale aufwendige Sequenzierung unter Anwendung von spezifischen Modifikationsreaktionen jeweils für die vier verschiedenen Nukleotide durchgeführt werden muß.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, eine Methode bereitzustellen, die es ermöglicht, nur in geringer Menge vorhandene Nukleinsäuren besonders schnell und einfach zu sequenzieren.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur direkten Sequenzierung von Nukleinsäureketten durch Denaturierung und dann Amplifizierung der zu sequenzierenden Bereiche durch mehrmaliges Durchlaufen eines Zyklus, umfassend

- a) einen Nukleinsäure-Syntheseschritt, bei dem die zu sequenzierende Nukleinsäure als Matrizenstrang in Anwesenheit der vier Deoxynukleosidtriphosphate von einer Polymerase, ausgehend von Oligonukleotid-Primern, die zu den 3'-Enden der antiparallelen Stränge der zu sequenzierenden Nukleinsäuren komplementär sind, repliziert wird, gefolgt von
- b) einem Denaturierungsschritt,

wobei die entstandenen Nukleinsäuren während oder nach der Amplifizierung an ihrem einen Ende markiert werden, Sequenzierung der markierten Nukleinsäuren durch Einbau modifizierter Nukleotide an jeweils für eine Base spezifischen Positionen, Verkürzung der amplifizierten Nukleinsäuren jeweils bis zu diesen Positionen und elektrophoretische Auftrennung der entstandenen Nukleinsäurefragmente, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man zur Modifikation bei der Amplifizierung in vier verschiedenen Ansätzen anstelle der vier Deoxynukleosidtriphosphate je ein Deoxynukleosid- α -thio-triphosphat zusammen mit den jeweils drei anderen unmodifizierten Deoxynukleosidtriphosphaten einsetzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine rasche und genaue Sequenzierung in nur einem Schritt, wobei die umständlichen Sequenzierungsmethoden, die in Verbindung mit Polymerase-Kettenreaktionen bisher im Stand der Technik beschrieben sind, vermieden werden können.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden nach erfolgter Kettenreaktion in den Amplifizierungszyklen in den vier Polymerisationsansätzen die amplifizierten Nukleinsäuren gefällt und gegebenenfalls nicht eingebaute Triphosphate nach an sich bekannten Methoden, z. B. chromatographisch, abgetrennt. Anschließend können Nukleinsäurefragmente mit geringerer Länge auf übliche Weise, z. B. gelelektro-

phoretisch, abgetrennt werden. Durch Zugabe eines Alkylierungsmittels zum größten bei der Auftrennung erhaltenen Fragment, gefolgt von Erhitzen wird eine partielle Spaltung der Nukleinsäuren an den Thiophosphat-Positionen der Nukleinsäuren bewirkt. Unter erhöhter Temperatur wird hierbei im Rahmen der Erfindung eine Temperatur verstanden, die zu einem partiellen Strangbruch an den modifizierten Stellen führt. Vorzugsweise wird im Rahmen der Erfindung auf zwischen 80°C und 95°C erhitzt. Aufgrund der Spaltungsbedingungen (siehe hierzu auch Gish und Eckstein supra) wird in den amplifizierten Nukleinsäuren statistisch an jeder Thiophosphat-Position mindestens einmal gespalten, die vier Ansätze, enthaltend jeweils verschiedene markierte Nukleinsäurefragmente, nebeneinander auf ein Sequenziergel aufgetragen, die Nukleinsäurefragmente, abhängig von der Art der Markierung, nach an sich bekannten Methoden (z. B. Autoradiographie) sichtbar gemacht und die Nukleinsäuresequenz abgelesen.

Als alkylierende Agentien können die aus dem Stand der Technik bekannten Alkylierungsmittel verwendet werden. Erfindungsgemäß bevorzugte Alkylierungsmittel sind hierbei 2-Jodethanol, 2,3-Epoxy-1-propanol, 2,3-Epoxypropyltrimethylammoniumchlorid, Jodessigsäure, Jodacetamid oder Cyanogenbromid, wovon wiederum besonders bevorzugt 2-Jodethanol und 2,3-Epoxy-1-propanol verwendet werden.

Andere erfindungsgemäß bevorzugte Alkylierungsmittel sind Methyljodid, Dimethylsulfat und Ethyljodid. Bei Verwendung dieser muß jedoch der pH-Wert im Ansatz vor der Temperaturerhöhung auf etwa 90°C durch Zugabe einer starken Base erhöht werden, vorzugsweise auf einen Wert von mindestens 11.

Alternativ können anstelle eines Alkylierungsmittels auch Jod/Ammoniak oder H₂O₂ als Spaltungsreagenzien eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist nach der Amplifizierung durch die Polymerase-Kettenreaktion keine zeitaufwendige Reinigung der amplifizierten Nukleinsäuren durch Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden oder/und Fragmenten mit geringerer Länge mehr erforderlich.

Es wurde nämlich überraschenderweise gefunden, daß bei der Amplifizierung neben dem erwarteten Produkt mit voller Länge eine Vielzahl von kürzeren Nukleinsäuren mit verschiedener Länge synthetisiert wird. Diese kürzeren Fragmente können bereits nach einer relativ geringen Anzahl von Amplifizierungszyklen beobachtet werden. Das Entstehen eines derartigen Fragmentgemisches wird bei einer Amplifizierung unter verschiedenen Reaktionstemperaturen (z. B. 59°C oder 71°C) oder unterschiedlicher Dauer der Amplifizierungszyklen (z. B. 3 Minuten oder 7 Minuten), sowie in An- wie auch in Abwesenheit von Thiophosphaten gefunden. Aufgrund dieser überraschenden Beobachtung ist es möglich, eine lesbare Sequenzleiter durch direkten Abbau der Enden des Nukleinsäuregemisches in 3'→5'-Richtung jeweils bis zu einem Thiophosphat zu erhalten.

Zur Durchführung einer derartigen Reaktion sind 3'→5'-Exonukleasen geeignet, die Thiophosphodiesterbindungen nur sehr schlecht gegenüber normalen Phosphodiester-Bindungen spalten können. Sequenzierverfahren, die auf diesem Prinzip beruhen, sind bereits bekannt (Labeit et al., (1986) DNA 5, 173-177; PCT-Anmeldung PCT/GB86/00349 der Firma AMERSHAM). Gemäß diesen Verfahren geschieht die Polymerisationsreaktion durch das Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase I, wobei in die DNA-Ketten ge-

ringe Mengen von Thiophosphat eingebaut werden. Der Abbau in 3'→5'-Richtung geschieht durch Exonuklease III. Substrate sind in diesem Falle DNA-Ketten mit voller Länge und einem statistischen Einbau von Thiophosphaten. Dagegen sind im erfindungsgemäßen Verfahren ein Gemisch aus DNA-Fragmenten mit unterschiedlicher Länge und einem vollständigen Einbau von Thiophosphat das Substrat für die Exonuklease.

Für das erfindungsgemäße Verfahren ist jedoch die Exonuklease III nicht sehr geeignet, da einige Banden auf der Sequenzleiter eine geringe Intensität besitzen und somit keine gut lesbare Basenfolge erhalten werden kann. Sehr gut geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren erweist sich überraschenderweise die Schlangengift-Phosphodiesterase, eine 3'→5'-Exonuklease, von der bekannt ist, daß sie Thiophosphodiesterbindungen um den Faktor 100 langsamer spaltet als Phosphodiester-Bindungen (Burgers und Eckstein (1979), Biochemistry 18, 592-596). Besonders geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren erweist es sich, wenn der Abbau der Nukleinsäureenden durch Schlangengift-Phosphodiesterase bei einer Reaktionstemperatur von 16°C erfolgt. Wenn am 5'-Ende eine Markierungsgruppe vorliegt, die einen Abbau vom 5'-Ende her unterbindet, kann auch eine 3'→5'-Exonuklease verwendet werden, die mit einer 5'→3'-Exonuklease-Aktivität assoziiert ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren offenbart also eine Sequenzierungsmethode, die auf schnellstmögliche Weise zur Kenntnis der Sequenz einer bestimmten Nukleinsäure führt und überdies besonders einfach durchzuführen ist.

Es war hierbei höchst überraschend, daß die bereits bei der Sequenzierungsmethode von Gish und Eckstein verwendeten Deoxynukleosid- α -thiotriphosphate als Substrate bei der Polymerase-Kettenreaktion keinerlei Verschlechterung der Ausbeute bzw. der Genauigkeit der Replikation bewirken und daß deshalb zwei Reaktionen, nämlich die Amplifizierung und Sequenzierung gleichzeitig durchgeführt werden können.

Bei der Polymerisations-Kettenreaktion wird, wie oben bereits ausgeführt, nach jedem Zyklus denaturiert, um die neu gebildeten Nukleinsäurestränge vom Matrizenstamm zu trennen. Hierdurch wird der alte Matrizenstamm für eine neue Syntheserunde zugänglich, ebenso wie die bereits in einem vorhergehenden Zyklus gebildeten neuen Nukleinsäuren. Dies geschieht durch Erwärmen auf mehr als 90°C, wodurch aber nicht-hitzestabile Polymerasen inaktiviert werden. Es muß daher bei Verwendung von nicht hitzestabilen Polymerasen für jeden Zyklus neue Polymerase zugegeben werden. Es ist deshalb erfindungsgemäß bevorzugt, zur Polymerisations-Kettenreaktion eine hitzestabile Polymerase zu verwenden, zur DNA-Synthese vorzugsweise die Taq-Polymerase, um dadurch das Verfahren weiter zu erleichtern.

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird erfindungsgemäß bevorzugt zur Denaturierung in jedem Zyklus auf 95 bis 96°C erhitzt. Hierbei wird ein besonders hoher Grad der Denaturierung erreicht, so daß die Kettenreaktion besonders effizient durchgeführt werden kann; auf der anderen Seite wird die hitzestabile bevorzugte Taq-Polymerase bei diesen Temperaturen nicht inaktiviert.

Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, 12 bis 30 Polymerisationszyklen durchzuführen, hierbei wird meist ausreichend Nukleinsäure hergestellt.

Ebenfalls ist es erfindungsgemäß bevorzugt, Primer

mit 10 bis 25 Nukleotiden Länge zu verwenden.

Geeignet ist für den Ablauf der Polymerisationszyklen beispielsweise bei Verwendung zweier 18-mer Oligonukleotide nach der Zugabe von Polymerase und Nukleotiden, die Abfolge: 3 Minuten 71°C, 1 Minute 95 bis 97°C und 2 Minuten 37°C. Beim letzten Zyklus wird die Periode bei 71°C auf 7 Minuten verlängert und dann auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Es ist bevorzugt, die angegebenen Schritte in einem gut isolierten Temperiersystem durchzuführen, so daß keine unkontrollierten Abweichungen von den gewünschten Temperaturen auftreten.

Bevorzugt vor allem für die Amplifizierung längerer Nukleinsäuren (größer als etwa 300 bp) ist hingegen ein Polymerisationszyklus mit der Abfolge: 7 Minuten 55°C, 1 Minute 95 bis 97°C und 2 Minuten 37°C.

Die Markierung der Nukleinsäuren zur späteren Sichtbarmachung der erhaltenen, durch Elektrophorese aufgetrennten Nukleinsäurefragmente kann erfindungsgemäß gleichzeitig mit der Amplifizierungsreaktion erfolgen, oder aber erst nach der Amplifizierungsreaktion. Hierbei ist es prinzipiell möglich, beide Stränge der Nukleinsäuren zu markieren, hierdurch wird es jedoch nötig, nach der Amplifizierungsreaktion und vor der Behandlung mit Alkylierungsmittel und partieller Spaltung die beiden komplementären Stränge beispielsweise durch Gelelektrophorese zu trennen, und die jeweiligen Einzelstränge getrennt oder aber auch nur einen der beiden komplementären Stränge dann mit dem Alkylierungsmittel zu behandeln. Da dies relativ aufwendig ist, ist es erfindungsgemäß bevorzugt, nur einen der beiden komplementären Nukleinsäurestränge zu markieren. Hierzu besteht wiederum die Möglichkeit, während oder nach der Amplifizierungsreaktion die Markierung durchzuführen. Verwendbar sind im Sinne der Erfindung die an sich bekannten Methoden zur Markierung von Nukleinsäuren.

Erfindungsgemäß bevorzugt sind radioaktive Markierungen, Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Enzym, das ein chromogenes Substrat unter Entwicklung einer erkennbaren Farbreaktion spaltet. Im Sinne der Erfindung ist unter einer Markierung mit einem Enzym auch eine Markierung über ein Konjugat zu verstehen, bei dem an die Nukleinsäure der eine Partner eines Bindungssystems gekoppelt ist, und das Enzym mit dem anderen Partner des Bindungssystems gekoppelt ist. Als Bindungssystem kommen hierbei an sich bekannte Bindungssysteme wie Biotin/(Strept)-Avidin oder Hapten/Antigen-Bindungspaare in Frage.

Zur Markierung während der Amplifizierung wird erfindungsgemäß einer der Primer in markierter Form verwendet. Besonders bevorzugt wird hierzu ein radioaktiv markierter Primer verwendet.

Zur Markierung nach der Amplifizierung wird erfindungsgemäß vorzugsweise ein Primer in an seinem 5'-Ende phosphorylierter Form zur Amplifizierung eingesetzt und danach der andere, nichtphosphorylierte Primer mit Hilfe einer Kinase radioaktiv phosphoryliert. Es sind jedoch auch andere an sich bekannte Methoden zur Markierung von Nukleinsäuren zur Sequenzierung anwendbar.

Die folgenden Beispiele in Verbindung mit der Abb. 1 bis 3 erläutern die Erfindung weiter.

Fig. 1 zeigt die Autoradiographie eines Sequenzgels der Sequenzierung einer Nukleinsäure nach Beispiel 1.

Fig. 2 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung von amplifizierten Nukleinsäuren in Abhängigkeit von der Zahl der Reaktionszyklen.

Fig. 3 zeigt die Autoradiographie eines Sequenzgels der Sequenzierung einer Nukleinsäure nach Beispiel 5.

Beispiel 1

Sequenzierung von nach der Kettenreaktion markierter DNA durch partielle Spaltung nach Alkylierung mit 2,3-Ethoxy-1-propanol.

a) Phosphorylierung des Oligonukleotidprimers
Ein Oligonukleotidprimer mit der Sequenz

5'-[AGGGTTTCCAGTCACG]

wurde vor der PCR-Amplifikation, wie von Taylor et al., Nucleic Acids Res. 13, (1985) 8765–8785 beschrieben, phosphoryliert. Hierzu wurden 40 µg Oligonukleotid mit 30 U (Einheiten) Polynukleotidkinase in einer Reaktionsmischung (30 µl), zusammengesetzt aus 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM MgCl₂ und 1 mM ATP behandelt. Nach zwei Stunden bei 37°C wurde die Reaktionsmischung auf 70°C für 15 Minuten erhitzt und das Produkt gereinigt unter Verwendung einer SEP-PAK-C18-Patrone (Waters Associates), wie von Ott und Eckstein, Biochemistry 26 (1987), 8237–8241, beschrieben, gereinigt. Das phosphorylierte Oligonukleotid wurde bei –20°C als wäßrige Lösung mit einer Konzentration von 10 A₂₆₀ Einheiten pro ml aufbewahrt.

b) Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktions-Amplifikation wurde manuell durchgeführt. BglI-verdaute lineare doppelsträngige M13 mp18-DNA wurde in einer Menge von 200 ng in 320 µl einer Lösung, enthaltend 63 mM KCl, 12,5 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,016% (w/v) Glycerin, 3,8 mM MgCl₂, 0,8 µM (0,07 A₂₆₀ Einheiten) 5'-phosphorylierter Oligonukleotidprimer und 0,8 µM (0,07 A₂₆₀ Einheiten) des nicht phosphorylierten Oligonukleotidprimers

5'-d[CACCCTGGCGCCCAATAC]-3'

gelöst. Die Hybridisierung der Oligonukleotide wurde durch Erhitzen bei 96 bis 97°C für 5 Minuten, um die DNA zu denaturieren und dann Abkühlen auf 37°C für 5 Minuten durchgeführt. Die Lösung wurde geteilt (80 µl) in vier 750 µl Eppendorf-Gefäße, auf 100 µl verdünnt mit einer Mischung von 3 Deoxynukleosidtriphosphaten und einem S_P-Deoxynukleosid-5'-O-(1-thiotriphosphat), das gemäß Taylor et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749–8764 hergestellt worden war, um eine Endkonzentration von 250 µM jedes der Deoxynukleotide zu ergeben und vier Einheiten Taq-DNA-Polymerase wurden zugegeben.

Über die Reaktionsmischung wurden 100 µl Paraffinöl geschichtet. Die Reaktionen wurden einem Temperaturzyklus von 71°C für 3 Minuten, 96 bis 97°C für eine Minute und 37°C für zwei Minuten 15 Zyklen unterworfen. Für den letzten Zyklus wurde die Reaktionszeit bei 71°C auf 5 Minuten verlängert, dann wurden die Proben auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Das Paraffinöl wurde abpipettiert und durch zweimaliges Waschen mit Ethylether (jeweils 200 µl) vollständig entfernt. Das amplifizierte Produkt konnte leicht in einem 1,5%igen Agarosegel durch Ethidiumbromid sichtbar ge-

macht werden, wobei etwa 8 µl der Mischung auf das Gel aufgetragen wurden.

c) Markierung der amplifizierten Fragmente Jedes amplifizierte Produkt wurde über eine Sephadex-G50-Schleuder-Säule (ca. 1 ml), die mit H₂O äquilibriert war, gereinigt, um überschüssige Nukleotide und Salz zu entfernen. Der Durchfluß der Säule wurde durch Zugabe von 10 µl 3M Natriumacetat, pH 6,0 und 500 µl absolutem Ethanol gefällt. Nach 10 Kühlen auf -78°C für 15 Minuten, gefolgt von Zentrifugation von 15 Minuten, wurde die überstehende Flüssigkeit abdekantiert und das Pellet mit 57 µl 70%igem Ethanol gewaschen und dann getrocknet.

Zu jedem Pellet wurden 30 µl Ci [γ -³²P] ATP zugegeben und die Lösungen nochmals getrocknet. Jedes Pellet wurde in 4,5 µl 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM MgCl₂ und 2,4 mM 2-Mercaptoethanol aufgenommen. Hierzu wurden 15 U (Einheiten, 0,5 µl) T4-Polynukleotidkinase zugegeben und die Reaktion 20 45 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde mit 2 µl einer Stoppmischung (96% Formamid, 10 mM EDTA, 0,1% (w/v) Bromphenolblau und 0,1% (w/v) Xylencyanol ff) gemischt und auf ein 8%iges Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen.

Nach Elektrophorese der amplifizierten Fragmente wurde durch 5minütige Belichtung eines Kodak X-Omat XAR-5 Films die DNA sichtbar gemacht. Die Fragmente wurden als zwei Banden vermutlich 30 aufgrund von unvollständiger Denaturierung gesehen. Beide Banden wurden ausgeschnitten und die DNA aus dem Polyacrylamidgel unter Verwendung der Methode von G.M. Rubin, Methods in Cell Biology, Vol. XII, Yeast Cells (1975), Ed. by D.M. Prescott, Seiten 45 bis 85, Academic Press, N.Y. extrahiert.

d) Sequenzierungsreaktion

Die radioaktiv markierten Fragmente wurden in ausreichend Wasser aufgelöst, um ungefähr 500 cps (pro µl Lösung) (wie durch Messung mit einem Geigerzähler festgestellt wurde) zu ergeben. Für jede Sequenzierungsreaktion wurden 4 µl DNA gut mit 2 µl Stoppmischung (siehe oben), enthaltend 0,5% (v/v) 2,3-Ethoxy-1-propanol gemischt. Diese Stoppmischungslösung wurde vor dem Experiment frisch zubereitet, um jegliche Möglichkeit der Hydrolyse des alkylierenden Reagenzes auszuschließen. Die Proben wurden auf 95°C 3 Minuten lang erhitzt und dann auf Eis abgekühlt, bevor sie auf ein 50 8%iges Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und ein Kodak-X-Omat-XAR-5-Film 48 Stunden lang ohne Verstärkerschirm belichtet. Fig. 1 zeigt die Autoradiographie dieses Sequenzgels.

Beispiel 2

Sequenzierung von während der Kettenreaktion 60 markierter DNA durch partielle Spaltung nach Alkylierung mit 2,3-Ethoxy-1-propanol

a) Radioaktive Markierung des Oligonukleotid-Primers

Der im Beispiel 1a) verwendete Oligonukleotid-Primer (4 µg) wurde phosphoryliert in einer 30 µl Reaktionslösung, die zusammengesetzt war aus

100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM MgCl₂, 60 µl Ci [γ -³²P] ATP und 60 Einheiten T 4-Polynukleotidkinase. Nach 45 Minuten bei 37°C wurde die Reaktionsmischung für 15 Minuten auf 70°C erhitzt und das Produkt unter Verwendung einer SEP-PAK C 18-Patrone (Waters Associates) gereinigt. Das radioaktiv markierte Oligonukleotid wurde als wäßrige Stammlösung mit 3,6 A₂₆₀ Einheiten pro ml aufbewahrt und hatte eine spezifische Aktivität von 3 x 10⁹ cpm pro A₂₆₀ Einheiten.

b) Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierung Die Polymerase-Kettenreaktion wurde, wie im Beispiel 1b) durchgeführt, mit der Ausnahme, daß anstelle des phosphorylierten unmarkierten Primers der radioaktiv markierte Primer verwendet wurde. Nach 15 Zyklen wurde das Paraffinöl entfernt und die DNA durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 6,0 und 250 µl absolutem Ethanol durch Kühlen auf -80°C 30 Minuten lang, gefolgt von 20 Minuten Zentrifugation gefällt. Überschüssiges Ethanol wurde durch zweiminütiges Trocknen der Pellets entfernt und die DNA in 20 µl mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 und 2 µl Stoppmischung (siehe oben) aufgelöst. Die amplifizierten Fragmente wurden auf einem 8%igen Polyacrylamid-Sequenziergel, wie oben beschrieben, gereinigt. Die Isolierung der DNA aus dem Gel und die Sequenzierungsreaktion wurden wie im Beispiel 1 beschrieben, durchgeführt.

Beispiel 3

Sequenzierung durch partielle Spaltung nach Alkylierung mit Dimethylsulfat

Radioaktiv markierte Polymerase-Kettenreaktions-Fragmente, die wie im Beispiel 1a) bis c) hergestellt wurden, wurden in ausreichend Wasser gelöst, um ungefähr 500 cps/µl Lösung (wie durch Messung mit einem Geigerzähler festgestellt wurde) zu ergeben. Für jede Sequenzierungsreaktion wurden 4 µl der Phosphorothioat enthaltenden DNA mit 2 µl 0,5% (v/v) wäßrigem Dimethylsulfat, das vor jedem Experiment frisch hergestellt wurde, verdünnt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Zur DNA-Spaltung wurden 2 µl 0,5 N-Natriumhydroxid zugegeben und die Proben drei Minuten lang auf 95°C drei Minuten lang erhitzt. Vor der Elektrophorese wurden 2 µl der Stoppmischung (96% Formamid, 10 mM EDTA, 0,1% (w/v) Bromphenolblau und 0,1% (w/v) Xylencyanol ff) zugegeben, die Proben nochmals drei Minuten auf 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und einer Gelelektrophorese wie unter 1d) beschrieben, unterworfen.

Beispiel 4.

Analyse von amplifizierten Nukleinsäuren in Abhängigkeit von der Zahl der Reaktionszyklen

M 13mp18 einzelsträngige DNA wurde über 21 Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion mit Taq-DNA-Polymerase von Cetus in Gegenwart von jeweils 250 µmol/l dCTP, dATP, dGTP und dTTP amplifiziert. Als nicht radioaktiv markierter Oligonukleotid-Primer wurde

65 5'-[CAC CCT GGC GCC CAA TAC]-3'.

als ³²P-markierter Oligonukleotid-Primer wurde

5'-[TTA CGC CAG CTG GCG AAA]-3'

verwendet. In 50 µl Reaktionsvolumen waren 50 ng DNA, 0,025% Nonidet P-40 (Sigma), 0,025% Tween 20 (BioRad), 2,5 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,4 und 2 pmol jedes Primers (0,1 Az60 Einheiten pro ml) enthalten. Die Reaktionslösung wurde mit 100 µl Paraffinöl überschichtet. Die Reaktion wurde in einem Techné PHC-1 programmierbaren Driblock unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 55°C, 7 Minuten; 96°C, 1,5 Minuten; 37°C, 2,5 Minuten über 21 Zyklen hinweg, gefolgt durch Erhitzen auf 55°C für 9,9 Minuten. Nach Beendigung der Reaktion wird das Paraffinöl entfernt und die Proben mit 400 µl Wasser gesättigtem Ether extrahiert.

Aus dem Reaktionsansatz wurden 5 µl Aliquots direkt nach Zugabe des Enzyms (Fig. 2, Spur a) und nach jeweils drei Amplifizierungs-Zyklen (Spuren b bis h) entfernt.

Fig. 2 zeigt die Produktverteilung in Abhängigkeit der Zahl der Reaktionszyklen. Nukleinsäuren, die kleiner als das erwartete Produkt (gekennzeichnet durch einen Pfeil) waren, traten bereits nach wenigen Zyklen auf.

Nach 21 Zyklen war das erwartete Produkt mit 384 bp Länge zwar das Hauptprodukt der Reaktion, es waren jedoch Terminationsprodukte von fast jeder Länge vorhanden. Ein entsprechender Versuch mit der Taq-Polymerase von Amersham brachte das gleiche Ergebnis.

Beispiel 5

Sequenzierung von während der Kettenreaktion markierter DNA durch Abbau der Nukleinsäureenden mit Schlangengift-Phosphodiesterase

Zur Sequenzierung wurde dieselbe DNA wie im Beispiel 4 verwendet. Die Amplifizierungs-Reaktion wurde in Gegenwart von ³²P markiertem

5'-[AGGGTTTTCCCAGTCACG]-3'.

250 µmol/l von 3 Deoxynukleosidtriphosphaten, jeweils 250 µmol/l von einem α-Thiodeoxynukleotid (Fig. 3, Spuren A, C, G und T) und ansonsten unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 4 beschrieben, durchgeführt.

Nach Entfernen des Paraffinöls wurde jedoch direkt zu jeweils 5 µl eines Reaktionsansatzes 1 µl einer 1:10-Verdünnung einer 2 ng/ml Schlangengift-Phosphodiesterase-Lösung (Boehringer Mannheim) gegeben. Die Proben wurden dann 15 Minuten lang bei 16°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe eines Stop-Puffers (96% Formamid, 10 mmol/l EDTA, 0,1% Bromphenolblau und 0,1% (Gew/Vol) Xylencianol FS) und 3minütiges Erhitzen auf 95°C beendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 8%igen Polyacrylamidgel.

Fig. 3 zeigt eine gut lesbare Sequenzleiter, die durch Behandlung von Nukleinsäure-Fragmenten aus einer Amplifikationsreaktion mit Schlangengift-Phosphodiesterase erhalten wurde.

Patentansprüche

1. Verfahren zur direkten Sequenzierung von Nukleinsäureketten durch Denaturierung und dann Amplifizierung der zu sequenzierenden Bereiche

durch mehrmaliges Durchlaufen eines Zyklus, umfassend

- a) einen Nukleinsäure-Syntheseschritt, bei dem die zu sequenzierende Nukleinsäure als Matrizenstrang in Anwesenheit der vier Deoxynukleosidtriphosphate von einer Polymerase, ausgehend von Oligonukleotid-Primern, die zu den 3'-Enden der antiparallelen Stränge der zu sequenzierenden Nukleinsäuren komplementär sind, repliziert wird, gefolgt von
- b) einem Denaturierungsschritt,

wobei die entstandenen Nukleinsäuren während oder nach der Amplifizierung an ihrem einen Ende markiert werden, Sequenzierung der markierten Nukleinsäuren durch Einbau modifizierter Nukleotide an jeweils für eine Base spezifischen Positionen, Verkürzung der amplifizierten Nukleinsäuren jeweils bis zu diesen Positionen und elektrophoretische Auftrennung der entstandenen Nukleinsäurefragmente, dadurch gekennzeichnet, daß man zum Einbau modifizierter Nukleotide bei der Amplifizierung in vier verschiedenen Ansätzen anstelle der vier Deoxynukleosidtriphosphate je ein Deoxynukleosid-α-thio-triphosphat zusammen mit den jeweils drei anderen unmodifizierten Deoxynukleosidtriphosphaten einsetzt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Amplifizierungsschritt ein Alkylierungsmittel zugibt und partielle Spaltung an den Positionen der modifizierten Nukleotide bewirkt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Amplifizierungsschritt nicht eingebaute Nukleotide und Nukleinsäurefragmente mit geringerer Länge abtrennt.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als Alkylierungsmittel 2-Jodethanol, 2,3-Epoxy-1-propanol, 2,3-Epoxypropyltrimethylammoniumchlorid, Jodessigsäure, Jodacetamid oder Cyanogenbromid verwendet.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Alkylierungsmittel 2-Jodethanol oder 2,3-Epoxy-1-propanol verwendet.

6. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als Alkylierungsmittel Dimethylsulfat, Methyljodid oder Ethyljodid verwendet und zusätzlich den pH-Wert im Ansatz vor dem Erhitzen durch Zugabe einer starken Base erhöht.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man den pH-Wert auf mindestens 11 erhöht.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Amplifizierungsschritt direkt eine 3'→5'-Exonuklease zugibt und einen Abbau bis zu den Positionen der modifizierten Nukleotide bewirkt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Exonuklease Schlangengift-Phosphodiesterase verwendet.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Inkubation mit Schlangengift-Phosphodiesterase bei einer Temperatur um 16°C durchführt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hitze-stabile Polymerase verwendet.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Taq-Polymerase verwendet.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Amplifizierung in Zyklen v n jeweils 7 Minuten bei 55° C durchführt.
14. Verfahren nach einem d r Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Denaturierung in jedem Zyklus auf 95 bis 96° C erhitzt. 5
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man 12 bis 30 Zyklen durchführt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, 10 dadurch gekennzeichnet, daß man Primer mit einer Länge von 10 bis 25 Nukleotiden verwendet.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man die amplifizierten Nukleinsäuren radioaktiv, mit einem Fluores- 15 zenzfarbstoff oder einem Enzym markiert.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man nur einen der beiden Nukleinsäurestränge markiert.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekenn- 20 zeichnet, daß man zur Markierung während der Amplifizierung einen der Primer in markierter Form verwendet.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekenn- 25 zeichnet, daß man einen radioaktiv markierten Primer verwendet.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Markierung nach der Amplifizierung einen der beiden Primer in an seinem 5'-Ende phosphorylierter Form zur Amplifizierung 30 einsetzt und danach den anderen, nicht phosphorylierten Primer mit Hilfe einer Kinase radioaktiv phosphoryliert.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 2

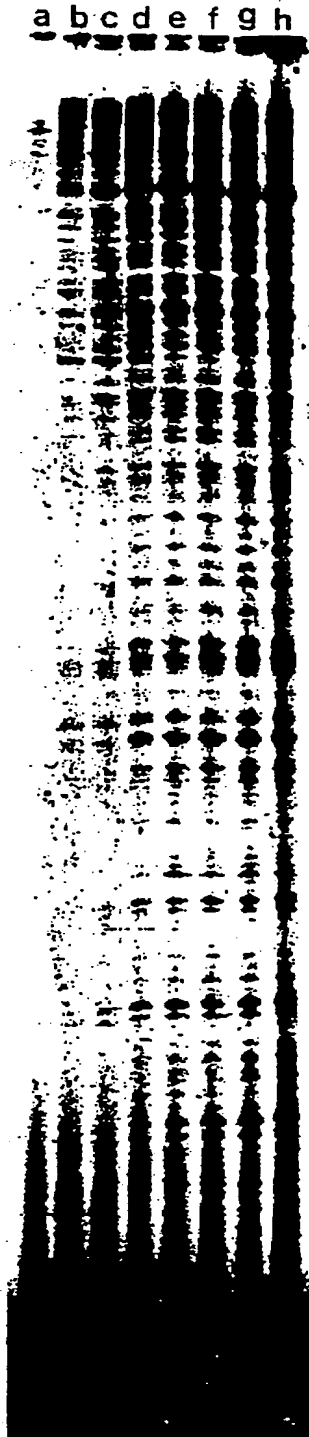


Fig. 3

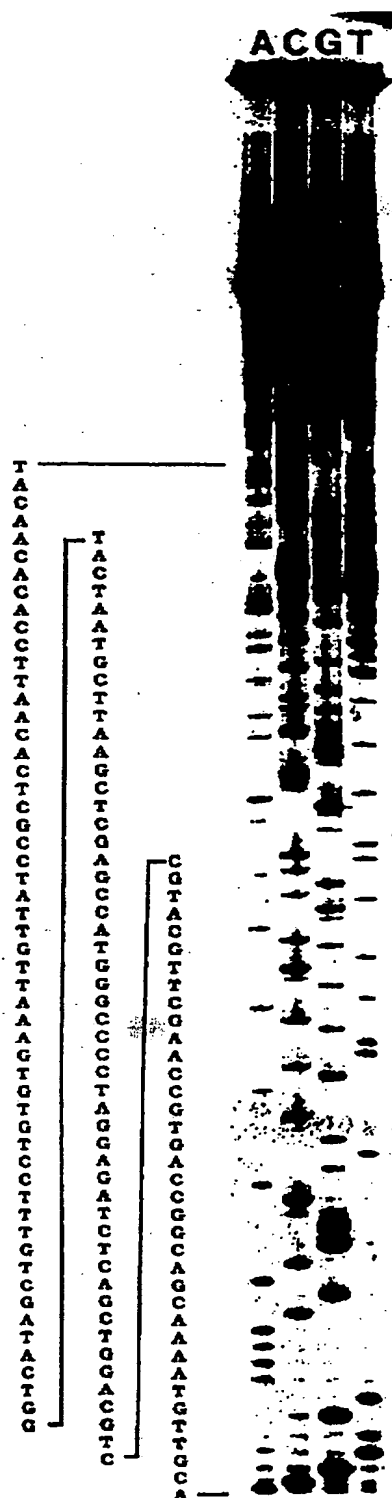


Fig.1

